

# HPLC 测定苦参碱平衡溶解度和表观油水分配系数

刘冰, 吕佳\*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 考察苦参碱在不同 pH 下的平衡溶解度和油水分配系数, 为设计苦参碱肝靶向制剂的开发提供基础。方法: 测定苦参碱在 pH 2 ~ 11 磷酸盐缓冲液的平衡溶解度和表观油水分配系数, 采用饱和溶液法和摇瓶法测定其表观溶解度, 通过苦参碱分配平衡后在油相(正辛醇)和水相的质量浓度比, 计算油水分配系数, 采用 HPLC 测定样品溶液的质量浓度。结果: 苦参碱在不同 pH 溶液均溶解, 油水分配系数随 pH 的增大有增大的趋势, 在有机溶剂中明显增大, 且随极性增大溶解度也增大。水中溶解度  $70.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 苦参碱在  $\text{pH} > 7.00$  时油水分配系数 ( $\lg P_{app}$ )  $> 1.0$ , 易于药物吸收。结论: 苦参碱既有亲水性又有亲脂性, 在碱性条件下脂溶性较好。

**[关键词]** 苦参碱; 平衡溶解度; 油水分配系数; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0043-03

## Determination of Equilibrium Solubility and Apparent Oil-water Partition Coefficient of Matrine by HPLC

LIU Bing, LV Jia\*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate equilibrium solubility and apparent oil-water partition coefficient of matrine at different pH values, and provide basis for development design of matrine liver targeting preparation. **Method:** Equilibrium solubility and apparent oil-water partition coefficient of matrine at pH 2 ~ 11 phosphate buffer were determined respectively, apparent solubility was determined by saturated solution method and shake-flask method, oil-water partition coefficient was calculated through mass concentration ratio of oil phase and water phase after balanced of matrine distribution, the concentration of sample liquid was determined by HPLC. **Result:** Matrine could dissolve in different pH solution, oil-water partition coefficient had tendency to increase with increasing of pH, it increased significantly in organic solvent, and solubility increased with polarity increasing. Solubility in water  $70.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , oil-water partition coefficient of matrxine ( $\lg P_{app}$ ) was greater than 1.0 when  $\text{pH} > 7.00$ , it could be easy to drug absorption. **Conclusion:** Matrine had hydrophilic and lipophilic, lipophilic was better under alkaline conditions.

**[Key words]** matrine; equilibrium solubility; oil-water partition coefficient; HPLC

苦参碱是从豆科植物苦豆子、苦参及山豆根中提取的一种生物碱, 呈白色或类白色结晶性粉末, 无臭、味苦, 分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}^{[1]}$ 。近年国内外在研

究和应用苦参碱时, 发现苦参碱具有抗病毒、抗肝纤维化、抗肿瘤、抗心律失常等多种药理作用, 国内目前主要应用苦参碱治疗急性慢性肝炎。根据近年来药理工作者的研究, 苦参碱具有较好的抗肝纤维化作用, 可将其开发成肝靶向的固体脂质纳米粒, 达到提高治疗效果, 减少毒副作用的目的<sup>[2]</sup>。

药物的油水分配系数和溶解度与药物的吸收密切相关, 是剂型设计的重要参数之一。因此, 本试验采用平衡溶解度法对不同介质中苦参碱的平衡溶解

**[收稿日期]** 20120508(005)

**[第一作者]** 刘冰, 在读硕士, 从事中药制剂研究, Tel: 15998655620, E-mail: andy4224@163.com

**[通讯作者]** \* 吕佳, 副教授, 从事药物新剂型研发, Tel: 15998541828, E-mail: 48707797@qq.com

度和表观油水分配系数进行了测定,测定 pH 范围广泛,并采用高效液相色谱法测定样品溶液的浓度,为开发苦参碱新剂型作基础研究。希望能为这一新药的剂型开发以及药物动力学研究提供参考。

## 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),85-1 型集热式恒温加热磁力搅拌器(金坛市金南仪器制造有限公司),85-1 型恒温磁力搅拌(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),SHA-C 型水浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司),PHS-2C 型酸度计(上海伟业仪器厂)。

苦参碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110805-200508),苦参碱原料药(宁夏盐池紫荆花药业有限公司,批号 90110531),甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(2)(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-甲醇-0.1% 磷酸水(20:5:75 三乙胺调 pH 8.00),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 206 nm,柱温室温,在此色谱条件下,苦参碱峰型较好,无干扰。

**2.2 标准曲线的建立** 准确称取苦参碱对照品 5.0 mg,置于 25 mL 量瓶中,加适量甲醇溶解并定容至刻度,摇匀得 0.2 g·L<sup>-1</sup> 储备液。精密量取一定量储备液于 10 mL 量瓶中,加甲醇配成 20, 40, 80, 120, 160, 200 mg·L<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液,分别进样 20 μL,记录峰面积,以苦参碱峰面积为纵坐标,苦参碱质量浓度为横坐标,得线性回归方程  $Y = 46.96X - 4.25$  ( $r = 0.9994$ ),结果表明苦参碱在 20 ~ 200 mg·L<sup>-1</sup> 与峰面积呈良好线性关系。另量取一定量 40 mg·L<sup>-1</sup> 苦参碱溶液于 10 mL 量瓶中,加甲醇配成 2, 4, 8, 12, 16, 20 mg·L<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液,同法得苦参碱线性回归方程  $Y = 46.91X + 30.48$  ( $r = 0.9997$ ),表明苦参碱在 2 ~ 20 mg·L<sup>-1</sup> 也呈良好线性关系。

**2.3 精密度试验** 取质量浓度分别为 4, 40 mg·L<sup>-1</sup> 的苦参碱溶液按上述色谱条件连续进样 6 次,结果 RSD 分别为 1.69%, 1.54%,表明仪器精密度良好。

**2.4 苦参碱平衡溶解度的测定** 按 Henderson-Hasselbalch 方程配制 pH 分别为 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 的磷酸盐缓冲液,用 pH 计验证,若有偏离,用 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 或 NaOH 校正酸度为所需数值。

将过量的苦参碱置于 5 mL 具塞玻璃离心管中,分别加入适量水、上述各种 pH 的磷酸盐缓冲溶液、甲醇、乙醇、正丁醇和正辛醇,于恒温 25 °C 磁力搅拌至苦参碱质量浓度稳定,恒温(25 ± 1) °C 置于恒温振荡器中 48 h,离心 10 min(4 000 r·min<sup>-1</sup>),取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,用适当甲醇稀释(10 μL → 10 mL)后进样 20 μL,记录峰面积。按外标法以峰面积计算苦参碱在各介质中的平衡溶解度,结果依次为 70.26, 116.97, 96.48, 74.14, 72.25, 70.03, 72.04, 69.71, 55.86, 55.85, 55.23, 870.16, 675.21, 662.54, 507.79 g·L<sup>-1</sup>。根据 2010 年版《中国药典》规定:溶质 1 g 能在溶剂 1 ~ 10 mL 中溶解的物质属于易溶,说明苦参碱在 pH 2 磷酸盐缓冲溶液、甲醇、乙醇、正丁醇及正辛醇溶液中均易溶,且溶解度随溶剂碳链长度的增加而降低。溶质 1 g 能溶解在溶剂 10 ~ 30 mL 中的物质属于溶解。说明在不同 pH 磷酸盐缓冲液中随溶剂 pH 升高,苦参碱溶解度呈下降趋势,其中酸性缓冲液中溶解度变化趋势明显,中性至碱性缓冲液中趋势变化较平稳。可能因为苦参碱与酸性溶剂结合成盐,增加了溶解度。由结果可知,苦参碱在水中溶解度 < 在中性缓冲液中溶解度,说明生成盐类有助于增溶作用。

**2.5 苦参碱表观油水分配系数的测定**<sup>[2,3]</sup> 取苦参碱适量溶于水饱和的正辛醇中,配成 1 g·L<sup>-1</sup> 的正辛醇溶液。取该溶液 2 mL 置于具塞试管中,分别加入正辛醇饱和的水及 pH 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00, 10.00, 11.00 的磷酸盐缓冲液各 2 mL,(25 ± 1) °C 水浴恒温振荡器中振荡 48 h 直至平衡,以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取下层水 0.5 mL 相稀释 10 倍后过滤,进样 20 μL,记录峰面积,代入标准曲线计算水相苦参碱质量浓度  $\rho_w$ ;另取 500 μL 正辛醇相于 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,过滤,进样 20 μL,记录峰面积,代入标准曲线计算油相苦参碱质量浓度  $\rho_o$ 。按公式  $P_{app} = \rho_o / \rho_w$  计算不同 pH 的磷酸盐缓冲液中表观油水分配系数。结果分别为 0.001, 0.001, 0.196, 0.052, 0.313, 1.182, 2.652, 4.216, 6.314, 8.690。

苦参碱溶于 25 °C 正辛醇饱和水中,测得其 pH 为 8.2,正辛醇-水表观分配系数 0.897。苦参碱在酸性缓冲液中油水分配系数很小(pH 2.00,  $\lg P_{app} = 3.244$ ),几乎完全分配在水相中,但随 pH 增加油水分配系数逐渐升高,在强碱性缓冲液中表观油水分配系数较大(pH 11.00,  $\lg P_{app} = 0.939$ ),增大趋势很明显且规律性,从 pH > 7.00 时,  $P_{app}$  均 > 1,油相分

配比重增大明显。

### 3 讨论

文献中苦参碱理化常数只采用紫外分光光度法测定,其结论是苦参碱在不同 pH 中均易溶,油水分分配系数成增大趋势,碱性条件下数值较大。与本试验 HPLC 测得的苦参碱在除 pH 2.00 外的缓冲液中溶解均有一定差别,油水分分配系数相对略小,整体趋势保持一致。由于苦参碱最大吸收波长为 206 nm,容易产生末端吸收,干扰试验结果,紫外分光光度法与 HPLC 相比,结果误差偏大,灵敏度不高,不能准确反应内在规律性。为下一步试验研究提供准确可靠的数据是很关键环节,故本试验采用 HPLC 测定。

药物必须具有一定的水溶性及脂溶性,使其能透过生物膜而被吸收。正辛醇-缓冲溶液分配系数和正辛醇-水分配系数在预测药物定量结构原吸收上具有重要意义。对苦参碱表观油水分配系数的测定,可为苦参碱剂型的工艺提供基础数据,还可为苦参碱构效关系、吸收代谢研究提供参考<sup>[4-6]</sup>。

本试验测定不同 pH 缓冲液中苦参碱的平衡溶解度和油水分分配系数。苦参碱在碱性条件下具有较强亲脂性,有利于该药在小肠上皮细胞黏膜上的吸收。苦参碱有一定的水溶性,可直接制成注射剂,目前市面上已有苦参碱注射液。本课题组在本研究的基础上,已采用固体分散体技术制备苦参碱固体脂质纳米粒,并对其修饰达到缓释和靶向的目的。在试验中发现,苦参碱的平衡溶解度与溶剂 pH 间有明显规律性,随溶剂 pH 不断升高,苦参碱溶解度呈下降趋势,由于苦参碱与酸性溶剂结合成盐,增加了溶解度。本研究得知苦参碱 25 ℃ 时在水及不同 pH 磷酸盐缓冲液中均易溶。苦参碱在有机溶剂中的溶

解度明显增加,且随有机溶剂极性的增大,溶解度也增大。测定苦参碱在不同溶剂中的溶解性,可为苦参碱的提取、纯化、生物样品的预处理提供参考。油水分分配系数是指当药物在水相和油相(非水相)达平衡时,药物在非水相中浓度和在水相中浓度之比。研究表明,较小的化合物吸收差,pH 1.0 的化合物吸收较好,在 pH >7.00 时脂溶性较好,而在酸性环境中不易吸收。因此,在制剂成型后要考虑溶液 pH,保证脂溶性以充分发挥药物的靶向性和药物吸收。

### [参考文献]

- [1] Lai J P, He X W, Jiang Y, et al. Preparative separation and determination of matrilie from the Chinese medicinal plant *Sophora flavescens* Air by molecularly imprinted solid-phase extraction [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 375 (2):264.
- [2] 杨小明,梁摇健,王驰芳,等.银杏酸平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J].时珍国医国药,2010,21(10):2586.
- [3] 杨建宏,王莉,王彤.苦参碱平衡溶解度及表观油水分配系数测定[J].宁夏医科大学学报,2011,33(5):498.
- [4] 钱一鑫,康冀川,文庭池,等.银杏黄酮苷元的平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J].时珍国医国药,2011,22(7):1643.
- [5] 陆彬.药物新剂型和新技术[M].2版.北京:人民卫生出版社,2005:384.
- [6] 孙进.现代药物制剂丛书-口服药物吸收与转运[M].北京:人民卫生出版社,2006:322.

[责任编辑 全燕]